



دانشگاه علوم پزشکی
و خدمات بهداشتی درمانی کرمان

دانشکده پزشکی

پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد

عنوان:

تشخیص مولکولی ایزوله های بالینی کاندیدا، بررسی حساسیت دارویی و
ژنوتایپینگ کاندیدا آلبیکنس های، جدا شده از نمونه های بالینی بیماران نقص
سیستم ایمنی در شهر کرمان به روش RAPD-PCR از خرداد ماه ۹۶ به مدت
یکسال

توسط:

سارا حمزه ئی

استاد راهنما:

پروفسور سید امین آیت الهی موسوی

استاد مشاور:

دکتر داوود کلاتر نیستانی

سال تحصیلی (تیر ماه ۹۸)

شماره پایان نامه: (۵۳۶)

مقدمه و اهداف: در دهه‌های اخیر، شیوع عفونت‌های قارچی فرصت طلب با عامل گونه-

های کاندیدا به ویژه در افراد دارای نقص سیستم ایمنی؛ به طور قابل توجهی افزایش یافته است. اگر چه گونه کاندیدا آلیکنس، مهم ترین گونه‌ی بیمارزا شناخته شده است با این حال میزان بروز عفونت‌های ناشی از گونه‌های غیر آلیکنس کاندیدا نیز به طور قابل توجهی رو به افزایش است. علاوه بر این، ظهور گونه‌های غیر آلیکنس کاندیدا، یک نگرانی بزرگ به حساب می‌آید، آن هم به دلیل تفاوت در حساسیت هر یک از این گونه‌ها به گزینه‌های درمانی، که می‌تواند روی درمان تأثیر بگذارد.

روش تحقیق: از خرداد ماه سال ۱۳۹۶ به مدت یک سال، از افراد دارای نقص سیستم ایمنی ۸۰ نمونه بالینی از بیمارستان‌های آموزشی شهر کرمان (افضلی پور، باهنر و شفا)، مرکز مشاوره بیماری‌های رفتاری شهر کرمان و نیز مراجعه کنندگان شخصی به آزمایشگاه قارچ شناسی پزشکی دانشکده پزشکی افضلی پور شهر کرمان جمع آوری گردید. جدایه-PCRهای مخمری توسط روش‌های متداول قارچ شناسی و هم چنین روش مولکولی

و R₄، OPE₁₈، OPE₀₄ در سطح گونه شناسایی شدند. هم چنین از ۴ پرایمر؛ RFLP

و یافتن قرابت ژنتیکی احتمالی میان ایزوله‌های کاندیدا RAPD-PCR برای آنالیز OPA₁₈

آلیکنس استفاده شد. حساسیت ضد قارچی تمام ایزوله‌های کاندیدا آلیکنس نسبت به

CLSI داروهای فلوکونازول، ایتراکونازول، نیستاتین و آمفوتریسین ب بر طبق دستورالعمل

سنجیده شد. (M27-A3)

یافته ها: از ۶۱ ایزوله کاندیدای به دست آمده در این مطالعه، کاندیدا آلیکنس با (۳۴/۴۲)

درصد)، گونه ی غالب را به خود اختصاص داده و در ادامه به ترتیب گونه های کاندیدا

گلابراتا (۲۴/۵۹ درصد)، کمپلکس کاندیدا پاراپسیلوزیس (۱۸/۰۳ درصد)، کاندیدا کروزه ای

(۱۴/۷۵ درصد)، کاندیدا کفیر (۳/۲۷ درصد)، کاندیدا لوزیتانیا (۳/۲۷ درصد) و کاندیدا

دابلینسیس (۱/۶۳ درصد) را شامل شدند.

نتایج RAPD-PCR به کمک پرایمر OPA₁₈ بیشترین، سازگارترین و تکرار پذیرترین باندها

را برای بیشترین ایزوله های کاندیدا آلیکنس نشان داد. ایزوله های کاندیدا آلیکنس با درصد

شباهت و هماهنگی بالای ۸۰ درصد به سه کلاس (A,B,C) تقسیم شدند.

نتایج آزمایش های حساسیت ضد قارچی نشان داد که ایزوله های کاندیدا آلیکنس بیشترین

حساسیت را به آمفوتریسین ب (۱۰۰ درصد) و سپس به ایتراکونازول (۹۰/۴۷ درصد) نشان

دادند. همچنین (۹/۵۲ درصد) و (۱۴/۲۸ درصد) از ایزوله های کاندیدا آلیکنس به ترتیب به

فلوکونازول و نیستاتین مقاوم بودند.

بحث و نتیجه گیری: یافته های ما نشان داد که؛ شناسایی قارچ های کاندیدا در سطح گونه،

برای انتخاب درمان ضد قارچی مناسب به ویژه در افراد دارای نقص سیستم ایمنی بسیار

ضروری به نظر می‌رسد. در مطالعه‌ی حاضر تمام گونه‌های کاندیدا با موفقیت توسط

روش مولکولی PCR-RFLP با بهره‌گیری از دو آنزیم *Bln I* و *Msp I* تعیین شدند.

همچنین دریافتیم که آزمون RAPD-PCR قادر به شناسایی تغییرات ژنتیکی در میان ایزوله

های کاندیدا آلیکنس می‌باشد.

، حساسیت ضد قارچی و ایران RAPD-PCR، RFLP، PCR کلمات کلیدی: گونه‌های کاندیدا،

Abstract

Background and Objectives: Over the past decades, the incidence of opportunistic fungal infections due to *Candida* species dramatically increased particularly in immunocompromised individuals. Although *Candida albicans* is the most significant pathogenic species, however the incidence of infections caused by non-*albicans Candida* (NAC) species has been substantially increased. Besides, the emergence of NAC species is a concern because these species susceptibility differences could affect therapeutic choices.

Methods: From May 2017 to June 2018 a total of 80 clinical samples of immunocompromised patients were collected from three University affiliated

hospitals (Shafa, Afzalipour, Bahonar) in Kerman, southeast of Iran. Yeast isolates were identified to the species level using conventional as well as PCR-RFLP methods. Also, four arbitrary primers including OPA₁₈, R₄, OPE₁₈ and OPE₀₄ were used for RAPD analysis of *C. albicans* strains. All *C. albicans* isolates were tested for their in vitro susceptibility to the Fluconazole, Itraconazole, Amphotericin B and Nystatin according to the CLSI document (M27-A3).

Results: sixty-one strains of *Candida* were obtained from clinical specimens of which *C. albicans* (34.42%) was the most common isolated species followed by *C. glabrata* (24.59%), *C. parapsilosis* complex (18.03%), *C. krusei* (14.75%), *C. kefyr* (3.27%), *C. lusitaniae* (3.27%) and *C. dubliniensis* (1.63%). RAPD-PCR results using OPA₁₈ primer indicated consistent and reproducible bands for mostly *C. albicans* isolates. *C. albicans* isolates allocate into three clusters (A, B, C) with higher than 80% homology level. The results of the antifungal susceptibility testing suggest that *C. albicans* isolates are the most susceptible to Amphotericin B (100%) followed by Itraconazole (90.47%). Moreover, 9.52% and 14.28% of isolates were resistant to Fluconazole and Nystatin, respectively.

Conclusion: Our funding indicated that identification to species level is important for choosing proper antifungal treatment mainly in immunocompromised patients. In the present study, all *candida* species were successfully determined by PCR-RFLP using *Msp I* and *Bln1* enzymes. We also could observe that RAPD assay was able to identify genetic variability among *C. albicans* isolates.

Keyword: *Candida* spp., PCR-RFLP, RAPD-PCR, Antifungal susceptibility, Iran



Kerman University of Medical Sciences

Faculty of Medicine

In Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree MSc

Title:

Molecular identification of clinical *Candida* species, and antifungal susceptibility and assessment the probability of genetic relationship by Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis of *C. albicans* isolated from immunocompromise patients in Kerman, Iran.

By:

Sara Hamzehee

Supervisor:

Seyyed Amin Ayatollahi Mosavi

Advisor:

Davood Kalantar-Neyestanaki

Thesis No: (536)

Year (July 2019)



بسمه تعالی

تاریخ: ۹۸.۴.۲۰

شماره: ۹۸.۴.۵۳۹

صور تجلسه دفاع از پایان نامه

پیوست:

دانشگاه علوم پزشکی کرمان

اصیلات تکمیلی دانشگاه

جلسه دفاعیه پایان نامه تحصیلی خانم سارا حمزه ئی دانشجوی کارشناسی ارشد رشته قارچ شناسی پزشکی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمان تحت عنوان " تشخیص مولکولی ایزوله های بالینی کاندیدا، بررسی حساسیت دارویی و ژنوتایپینگ کاندیدا آلبیکنس های جدا شده از نمونه های بی بیمار از نقص سیستم ایمنی در شهر کرمان به روش RAPD-PCR از خرداد ماه ۹۶ به مدت یکسال " در ساعت ۱۰ صبح روز شنبه مورخ ۹۸/۴/۲۲ بر اعضای محترم هیات داوران متشکل از:

سمت	نام و نام خانوادگی	امضا
الف: استادان راهنما	جناب آقای دکتر سید امین آیت اللهی موسوی	
ب: استادان مشاور	جناب آقای دکتر داوود کلاتر	
ج: عضو هیات داوران (داخلی)	جناب آقای دکتر ایرج شریفی	
د: عضو هیات داوران (خارجی)	سرکار خانم دکتر فریبا شریفی فر	
ه: نماینده تحصیلات تکمیلی	سرکار خانم دکتر سمیرا سالاری	

کلیه گردید و ضمن ارزیابی به شرح پیوست با درجه عالی و نمره ۲۵ مورد تأیید قرار گرفت.

مهر و امضاء معاون آموزشی

